

STIC-ILL

379,587 NO

From: Canella, Karen
Sent: Sunday, January 20, 2002 1:12 PM
To: STIC-ILL
Subject: ill order 09/802,457

5650024

Art Unit 1642 Location 8E12(mail)

Telephone Number 308-8362

Application Number 09/802,457

1. Clinica Chimica Acta, 1976 Jul 1, 70(1):103-112
2. Trans All-India Inst Ment Health, 1969, Vol 9, pp. 35-38.
3. Neurology, 1968 Apr, 18(4):397-402
4. Path Biol (Paris), 1963 Jun-Jul, Vol. 11, pp. 729-741
5. Clinical chemistry, 1989 Jun, 35(6): 972-974
6. Cancer, 2001 Aug 15, 92(4): 856-862
7. Revue Neurologique, 1992, 148(6-7): 417-422
8. Cancer Research:
1990 Oct 1, 50(19): 6364-6370
1987 Jul 15, 47(14):3766-3770
9. Cancer Bull, 1981, 33(6):250-254
10. Acta Neurochirurgica, 1971, 25(1):57-68
11. Neurology, 1968 Apr, 18(4):397-402
12. Int J of Cancer, 1996 Aug 22, 69(4):350-353
13. Clin Chem, 1997 Jan, 43(1):85-91
14. Calcif Tissue Int, 1997 Sep, 61(3):183-188
15. J Natl Cancer Inst, 1998 Jul 1, 90(13):1000-1008
16. Clin Cancer Research, 1999 Dec, 5(12): 3914-3919
17. Br J Haematol, 2000 Dec, 111(4):1118-1121
18. Thyroid, 1998 Aug, 8(8):637-641

Thanks!

Scientific and Technical
Information Center
JAN 24 RECD
PAT. & T.M. OFFICE

NOT LISTED

*Same as the
Cancer Res 1990
article*

EXPRESSION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION N.CAM, L1 ET DE L'ÉPITOPE HNK1 PAR LES MÉDULLOBLASTOMES

D. FIGARELLA-BRANGER**, P. DURBEC*, N. BIANCO**
D. GAMBARELLI**, J.F. PELLISSIER**, G. ROUGON*

* URA 179 CNRS, Faculté des Sciences de Luminy, Marseille

** Laboratoire d'Anatomie Pathologique et de Neuropathologie
Faculté de Médecine, Marseille

RÉSUMÉ

L'expression de certaines molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines : N.CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), L1 et l'épitope HNK1 a été recherchée dans 12 cas de médulloblastome de l'enfant par des techniques biochimiques et immunocytochimiques. Un anticorps monoclonal a permis d'établir une distinction entre les formes polysialysées (PSA) de N.CAM et leur isoformes adultes.

Toutes les cellules tumorales exprimaient l'épitope HNK1, N.CAM et sa forme polysialysée dans les 12 médulloblastomes. L'immunomarquage était membranaire. L1 n'a jamais été trouvé, sauf dans un cas, où l'immunomarquage était faible et non confirmé par Western blot.

Le profil d'expression de ces molécules d'adhésion est caractéristique des médulloblastomes et distingue ces tumeurs des autres tumeurs neuroectodermiques primitives ; il peut être comparé à celui des cellules de la couche granulaire externe du cervelet à la phase post-mitotique.

Enfin PSA-N.CAM a pu être mise en évidence par Western blot dans le liquide céphalo-rachidien de patients présentant une dissémination métastatique de leur tumeur. Ceci pourrait s'avérer particulièrement intéressant pour le suivi thérapeutique des patients.

Expression of adhesion molecules N.CAM, L1 and of the HNK1 epitope by medulloblastomas.

D. FIGARELLA-BRANGER, P. DURBEC, N. BIANCO, D. GAMBARELLI, J.F. PELLISSIER, G. ROUGON. *Rev. Neurol. (Paris)*, 1992, 148 : 6-7, 417-422.

SUMMARY

Twelve medulloblastomas were screened for their expression of adhesion molecules L1, N.CAM isoforms and HNK1 epitope by Western blotting and immunohistochemistry. Highly sialylated N.CAM isoforms were distinguished from total N.CAMs by using a monoclonal antibody (anti-MenB) specifically recognizing high polymers of 2-8 linked neuraminic acid. All tumors expressed HNK1 epitope, N.CAM and its highly sialylated isoforms on their surface membrane. L1 adhesion molecule was detected by immunohistochemistry in only one medulloblastoma. This spectrum of expression of cell surface adhesion molecules distinguishes medulloblastomas from other primitive neuroectodermal tumors. Medulloblastomas share some immunological features with post-mitotic cells forming the external granular layer of the cerebellum. Western blotting analysis of cerebrospinal fluid (CSF) samples with anti-MenB antibody enabled us to detect highly sialylated N.CAM in some samples. The presence of this antigen in CSF appears to correlate with meningeal spreading of medulloblastomas and could help monitoring chemotherapeutic treatment.

Les phénomènes d'adhésion cellulaire jouent un rôle important dans le comportement biologique des tumeurs et leur potentiel métastatique. Les molécules de la superfamille des immunoglobulines interviennent dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire indépendants du calcium (Williams et Barclay, 1988). Parmi ces molécules, N.CAM (neural cell adhesion molecule) a sans doute été la plus étudiée. N.CAM existe sous plusieurs isoformes générées par la combinaison de mécanismes d'épissage

alternatif d'un même gène et de diverses modifications post-traductionnelles comme la glypiation (He *et al.*, 1986), la phosphorylation (Gennarini *et al.*, 1984) et la glycosylation (Rougon *et al.*, 1982 ; Finne *et al.*, 1983).

Dans le cerveau embryonnaire, les isoformes de N.CAM sont hautement sialylées et les acides sialiques représentent plus de 30 p. 100 du poids de la molécule (Rougon *et al.*, 1982). De plus, ces acides sialiques se présentent sous la forme (inhabituelle chez les mammifères) de polymères où

Tirés à part : Dr D. FIGARELLA-BRANGER, Laboratoire d'Anatomie Pathologique et de Neuropathologie, Faculté de Médecine, 27, bd Jean Moulin, 13285 Marseille.

les résidus sont enchaînés en alpha 2,8 (Finne *et al.*, 1983). L'encombrement stérique et la charge électro-négative engendrés par ces formes polysialysées de N.CAM (PSA.N.CAM) sont responsables d'une diminution des phénomènes d'adhésion cellulaire.

Lors de la maturation du système nerveux central (SNC) N.CAM perd ses acides sialiques qui représentent, à terme, moins de 10 p. 100 du poids de la molécule. Un anticorps monoclonal dirigé contre la capsule du méningocoque B permet de distinguer spécifiquement PSA-N.CAM de N.CAM adulte (Rougon *et al.*, 1986). La molécule L1 (Rathjen *et al.*, 1984) fait partie d'un sous-groupe de molécules de la superfamille des immunoglobulines où l'on trouve également TAG (Yamamoto *et al.*, 1986), F3 (Gennarini *et al.*, 1989) et F11 (Chang *et al.*, 1987). Ces molécules présentent d'importantes homologues de structures et des domaines « fibronectine-like ».

Enfin, l'épitope HNK1 est un carbohy-drate comprenant un sulfatide glycuroné, qui peut être présent sur toutes les molécules décrites ci-dessus (Kruse *et al.*, 1984). La régulation de l'expression de HNK1 sur la molécule N.CAM se fait indépendamment de celle du squelette protéique, ce qui contribue à augmenter la diversité moléculaire. Dans le SNC, la répartition de ces molécules, surtout étudiée chez l'animal, est la suivante : L1 est présente sur les membranes des neurones (Rathjen *et al.*, 1984, Wolff *et al.*, 1988), et N.CAM sur toutes les cellules d'origine neuroectodermique mais avec une grande variété concernant le taux ou la nature des isoformes exprimées (Edelman, 1986b). L'expression de ces molécules est régulée au cours du développement et leur rôle a été démontré dans de nombreux événements développementaux (Edelman, 1986a, Edelman, 1986b, Walsh 1988). Enfin, N.CAM, par la variété des isoformes exprimées, pourrait jouer un rôle de modulateur des interactions cellulaires (Rutishauser *et al.*, 1989).

Les médulloblastomes représentent 12 à 25 p. 100 des tumeurs de l'enfant (Dehner, 1987). Il s'agit de tumeurs malignes et une de leurs caractéristiques est d'essaimer dans le liquide céphalo-rachidien (Farwell *et al.*, 1984). La recherche d'éléments tumoraux dans le LCR est importante pour le pronostic et le suivi thérapeutique des patients. Les médulloblastomes sont des tumeurs d'origine neuroectodermique dont l'histogenèse est encore mal connue (Rorke, 1983). Certains auteurs les classent dans le large sous-groupe des « PNET » (primitive neuroectodermal tumor) au même titre que les épendymoblastomes et les pinéoblastomes (Gould *et al.*, 1990).

Nous avons recherché l'expression des molécules L1, N.CAM et de l'épitope HNK1 par les médulloblastomes. Il est connu que les tumeurs ré-expriment souvent des molécules transitoirement exprimées au cours du développement (Kennedy, 1982). L'expression ou l'absence de ces molécules dans les médulloblastomes pourrait permettre de préciser leur histogenèse et de définir de nouveaux marqueurs tumoraux, pour l'étude du LCR par exemple.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRÉLÈVEMENTS TISSULAIRES

Douze médulloblastomes ont été retenus pour cette étude. Dans tous les cas, il existait un fragment congelé dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide et stocké à - 80°C. L'étude histologique conventionnelle et immunocytochimique sur coupes incluses en paraffine à l'aide d'anticorps contre différentes protéines du cytosquelette a permis de distinguer : un médulloblastome (cas 1), deux médulloblastomes desmoplastiques (cas 9 et 11), un médulloblastome avec différenciation gliale (cas 7), un médulloblastome avec différenciation neuronale (cas 8) et sept médulloblastomes peu différenciés. De rares cellules GFAP positives étaient observées dans les cas 1, 3-6, 9-12. Des cellules exprimant la synaptophysine ont été mises en évidence dans les cas 1, 5, 6 et 8.

D'autres tumeurs neuroectodermiques (gliomes, épendymomes, neuroblastomes) et des tissus humains normaux avaient fait l'objet d'une publication antérieure (Figarella-Branger *et al.*, 1990) et cette étude n'a pas comporté de nouveaux contrôles.

L'expression de PSA-N.CAM a également été recherchée dans 10 liquides céphalo-rachidiens : sujets porteurs de médulloblastome (7), témoins normaux (2) et inflammatoire (1).

ANTICORPS

Les anticorps suivants ont été utilisés :

- Anticorps anti-N.CAM polyclonal. Cet anticorps reconnaît la portion NH2 terminale commune à toutes les molécules N.CAM (Rougon et Marshak, 1986b).
- Anticorps monoclonal dirigé contre la capsule du méningocoque B. Cet anticorps reconnaît une chaîne d'acides sialiques en alpha 2-8, il permet de distinguer spécifiquement PSA-N.CAM de N.CAM adulte (Rougon *et al.*, 1986).
- Anticorps monoclonal anti-HNK1 (ATCC : American Tissue Culture Collection, Rockville).
- Anticorps polyclonal anti-L1 (généreusement fourni par F. Rathjen, Hambourg).
- Anticorps polyclonal anti-neurone-spécifique-énolase (NSE), anti-protéine-gliofibrillaire-acide (GFAP) (Orthodiagnostic System, Roissy, France), anticorps monoclonal dirigé contre les trois classes de neurofilaments (NF) (Biosoft), anticorps monoclonal anti-desmine (Immunotech, Marseille), anticorps monoclonal anti-vimentine et antisynaptophysine (Dakopatts, Versailles, France).

MÉTHODES

Les modalités d'extractions tissulaires, les techniques de Western blot ont été décrites de façon détaillée précédem-

TABLEAU 1. — Expression de l'énolase spécifique des neurones (NSE) des neuro-filaments totaux, de la vimentine, de la desmine, de la protéine glionfibrillaire acide (GFAP) et de la synaptophysine dans 12 cas de médulloblastome (coupes incluses en paraffine).

Semi quantitative assessment of the immunolabelling by antibodies directed against neuron specific enolase, total neurofilaments, vimentin, desmin, GFAP and synaptophysin in 12 cases of medulloblastoma (paraffin embedded sections).

Mb	NSE	Neurofilament	Vimentine	Desmine	GFAP	Synaptophysine
1	+	+	++	++	+a	+
2	++	—	+++	—	—	—
3	+++	—	—	—	+a	ND
4	+++	—	—	—	+a	—
5	+++	—	—	—	+a	+a
6	+++	—	—	—	+a	+a
7	+++	—	—	—	+	—
8	+++	+	—	—	—	+a
9	++ îlots pâles	—	—	—	+a	—
10	+++	—	—	—	+a	—
11	+++	—	—	—	+a	—
12	+++	—	—	—	+a	—

a : très rares cellules positives (< 1 %). ND : non déterminé.

ment (Figarella-Branger *et al.*, 1990). Les techniques immunocytochimiques (coupes à congélation ou coupes incluses en paraffine) étaient des techniques d'immunoperoxydase avec le complexe ABC (Hsu *et al.*, 1981). L'étude immunohistochimique a porté sur toutes les tumeurs, celle en Western blot sur les cas 1-4, 8 et 12.

Des techniques en Western blot ont été utilisées pour la détection de PSA-N.CAM dans les liquides céphalo-rachidiens (LCR) de sujets porteurs de médulloblastomes et de sujets contrôles (témoins normaux et inflammatoires). Les LCR étaient concentrés 2,5 fois puis bouillis pendant trois minutes dans du tampon réducteur (v/v). Le même volume de solution finale (soit 10 µl) a ensuite été résolu en gel de polyacrylamide à 7,5 p. 100, la procédure technique a été identique à celle décrite précédemment.

RÉSULTATS

A. EXPRESSION DE MOLÉCULES D'ADHÉSION N.CAM, L1 ET DE L'ÉPITOPE HNK1 DANS LES MÉDULLOBLASTOMES.

Expression de N.CAM et PSA-N.CAM (fig. 1A et B)

Toutes les cellules tumorales, dans toutes les tumeurs,

exprimaient N.CAM. En immunocytochimie, le marquage était membranaire et uniforme à la surface des cellules tumorales. En Western blot, une large bande migrant entre 250 et 140 kD et une bande plus étroite migrant à 140 kD étaient visibles dans tous les cas. Une bande migrant à 120 kD était aussi observée dans les cas 2, 4, 8 et 12. La large bande migrant entre 250 et 140 kD habituellement observée dans le cerveau embryonnaire (Rougon *et al.*, 1986), est caractéristique de PSA-N.CAM. L'existence de PSA-N.CAM a pu être confirmée par des techniques immunocytochimiques dans tous les cas, biochimiques dans les cas 1-4, 8 et 12. Toutes les cellules tumorales étaient fortement immunoréactives avec l'anticorps anti-MenB à l'exception du cas 11 où des groupes de cellules moins immunoréactives étaient observés.

Expression de HNK1 (fig. 1C)

En immunocytochimie toutes les cellules présentaient un marquage membranaire avec l'anticorps monoclonal anti-HNK1. L'étude biochimique a montré la présence de l'épitope sur un grand nombre de molécules.

Expression de L1 (fig. 1D)

Seules les cellules de la tumeur n° 8 montraient un faible marquage membranaire avec l'anticorps anti-L1 polyclonal. Cependant, l'étude biochimique n'a pas confirmé l'expres-

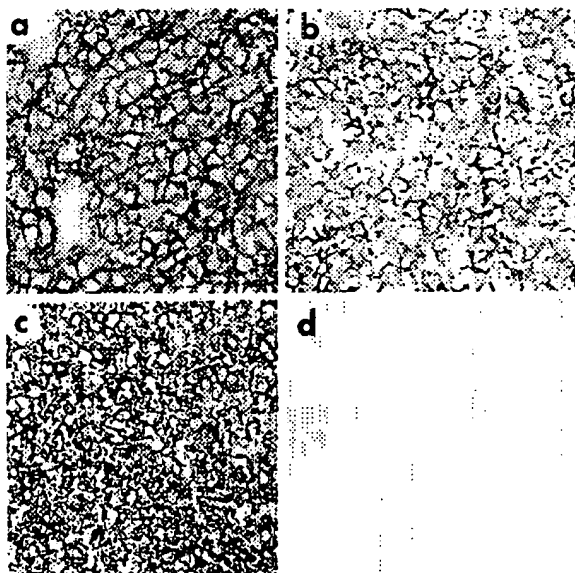


FIG. 1. — Analyse immunocytochimique. Toutes les cellules tumorales expriment N.CAM (A), PSA-N.CAM (B) et HNK1 (C) sur leur membrane, mais pas L1. A : cas n°12 ; B, C, D : cas n°4. A et B $\times 300$; C et D $\times 250$.

All tumor cells express N.CAM (A), PSA-N.CAM (B) and HNK1 (C) on their surface membrane, but not L1 (D). A : case 12 ; B, C, D : case 4. A et B $\times 300$; C et D $\times 250$.

sion de L1 dans ce cas. La molécule L1 était donc absente ou très faiblement exprimée dans les 12 médulloblastomes analysés.

B. MISE EN ÉVIDENCE DE PSA-N.CAM DANS LES LCR (fig. 2)

PSA-N.CAM avait été mise en évidence dans certains LCR de sujets présentant un médulloblastome par des techniques d'immunodotting (Figarella-Branger *et al.*, 1990). Dans la présente étude, l'existence de la molécule a été confirmée par Western blot. Les LCR positifs correspondaient toujours à des sujets porteurs de médulloblastome. Dans ces cas l'étude histologique conventionnelle avait montré ou non des placards tumoraux.

PSA-N.CAM n'a pas été mise en évidence chez les sujets contrôlés (LCR normaux et LCR inflammatoires).

COMMENTAIRES

Tous les médulloblastomes analysés présentaient un profil antigénique similaire quant à l'expression des molécules d'adhésion N.CAM, PSA-N.CAM, L1 et de l'épitope

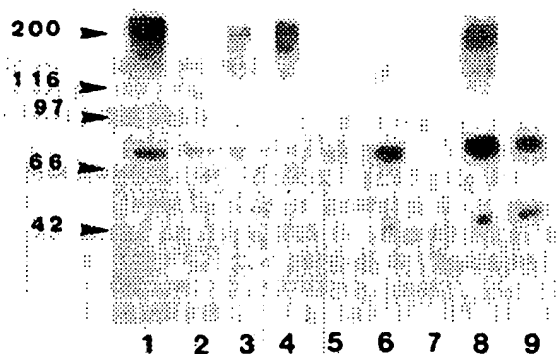


FIG. 2. — Mise en évidence de PSA-N.CAM dans les LCR.

- une large bande migrant entre 250 et 140 kD correspondant à PSA-N.CAM est visible dans les lignes 1, 3-6 et 8.
- Les bandes à 70 kD sont des chaînes lourdes d'immunoglobulines (Ig) de type IgM.
- Les lignes 1 à 5 correspondent à un même patient porteur d'un médulloblastome à des temps différents de l'évolution.
- Les lignes 6 et 7 correspondant à un autre patient porteur d'un médulloblastome.
- La ligne 8 à un broyat de la tumeur cérébrale du patient n° 12.
- Enfin la ligne 9 à un LCR inflammatoire de contrôle où seules les chaînes lourdes des IgM sont visibles.

Evidence of PSA-N.CAM in CSF.

A broad band, characteristic of PSA-N.CAM is observed on lanes 1, 3-6, 8. Additional bands (70 kD) corresponding to immunoglobulin are also observed in some cases.

- Lanes 1 to 5 : one patient with medulloblastoma at various stages of the disease.
- Lanes 6, 7 : another patient with a medulloblastoma.
- Lane 8 : tumor 12.
- Lane 9 : inflammatory CSF taken as control.

HNK1 et ceci quel que soit leur type histologique ou leur degré apparent de différenciation cytosquelettique. Parmi les molécules recherchées, L1 et PSA-N.CAM pourraient s'avérer particulièrement utiles pour le diagnostic et l'histogénèse de ces tumeurs. L'épitope HNK1, n'est pas spécifique des médulloblastomes : il a été mis en évidence dans de nombreuses tumeurs neuroectodermiques (Perentes et Rubinstein, 1986, Figarella-Branger *et al.*, 1990). Cependant, comme l'avait montré l'analyse biochimique, le nombre et la nature des molécules portant l'épitope peuvent varier d'une tumeur à l'autre. Ces données expliquent probablement qu'après fixation formolée et inclusion en paraffine, HNK1 ne soit plus détectable dans certaines tumeurs comme les épendymomes qui expriment très faiblement l'épitope (Figarella-Branger *et al.*, 1991). La détection de N.CAM total par des techniques immunocytochimiques n'est pas non plus un bon marqueur diagnostique dans la mesure où de nombreuses tumeurs neuroectodermiques expriment cette molécule (Figarella-Branger *et al.*, 1990 ; Mechttersheimer *et al.*, 1991 ; Jin *et al.*, 1991). En revanche, la mise en évidence de N.CAM par des

techniques biochimiques permettant d'identifier les isoformes semble plus intéressante. En effet, l'expression de celles-ci varie selon le type de tumeurs neuroectodermiques examinées, comme cela a été montré précédemment (Figarella-Branger *et al.*, 1990).

La molécule L1 n'a jamais été mise en évidence dans les médulloblastomes par les techniques biochimiques. Elle était aussi absente dans les épendymomes et les gliomes alors que les neuroblastomes et les neurocytomes l'expriment (Figarella-Branger *et al.*, 1990, 1992). Ainsi L1, qui dans le SNC est présente uniquement dans les neurones (Rathjen et Schachner 1984, Wolff *et al.*, 1988), est aussi exprimée dans les tumeurs neuronales. Il est intéressant de constater que certaines cellules de la tumeur 8 exprimaient L1 en immunocytochimie. Dans ce cas, un immunomarcage avec les anticorps anti-neurofilaments et antisynaptophysine laissait suspecter une différenciation neuronale. Le niveau d'expression de L1 était cependant faible puisque l'étude biochimique ne permettait pas de mettre en évidence la molécule.

Enfin, la mise en évidence de PSA-N.CAM a un triple intérêt. Diagnostique tout d'abord : tous les médulloblastomes exprimaient PSA-N.CAM. Les épendymomes, les gliomes n'exprimaient pas la molécule, alors qu'elle est observée dans les neuroblastomes peu différenciés (Figarella-Branger *et al.*, 1990). De plus, PSA-N.CAM peut être mise en évidence dans le LCR des patients, de façon sensible et spécifique par différentes techniques biochimiques. Cette molécule pourrait constituer un marqueur intéressant pour le suivi thérapeutique des patients.

L'expression de PSA-N.CAM a aussi un intérêt histogénétique. En effet, cette molécule, présente au cours du développement, apparaît sur des cellules déjà engagées vers un phénotype de différenciation donné. Elle est absente des cellules précurseurs (Rougon *et al.*, 1986 ; Boisseau *et al.*, 1991). Dans le cervelet de souris en développement, PSA-N.CAM est absente de la matrice, des cellules mitotiques, mais est exprimée transitoirement par les cellules de la couche granulaire externe à la phase post-mitotique (Hekmat *et al.*, 1990). Les médulloblastomes pourraient dériver de ces cellules avant qu'elles n'expriment L1 (Persohn et Schachner, 1987). Plusieurs auteurs avaient déjà postulé que les médulloblastomes pourraient dériver de la couche granulaire externe du cervelet (Stevenson et Echlin 1934, Kadin *et al.*, 1970). L'étude des molécules d'adhésion permet de donner un support moléculaire à ces théories.

Le troisième intérêt de PSA-N.CAM est de constituer un marqueur potentiel pour l'imagerie ou le ciblage de drogue chimiotoxique. En effet, cette molécule exprimée à la surface des cellules des médulloblastomes est absente dans le SNC mature (à l'exception de certaines structures douées de plasticité ; Théodosis *et al.*, 1991). L'utilisation de ce marqueur imposerait bien évidemment d'autres études concernant son expression éventuelle dans d'autres circonstances pathologiques comme par exemple les glioses réactionnelles.

RÉFÉRENCES

- BOISSEAU S., NEDELEC J., POIRIER V., ROUGON G., SIMMONEAU M. (1991). Analysis high PSA-N.CAM expression during mammalian spinal cord and peripheral nervous system development. *Development*, 112: 69-82.
- CHANG S., RATHJEN F.G., RAPER J.A. (1987). Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J Cell Biol*, 104: 355-362.
- DEHNER L.P. (1987). Pediatric surgical pathology. Second Edition, Baltimore. *Williams & Wilkins*, pp. 1026-1102.
- EDELMAN G.M. (1986a). Cell adhesion molecules in neural histogenesis. *Annu Rev Physiol*, 48: 417-430.
- EDELMAN G.M. (1986b). Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol*, 2: 81-116.
- FARWELL J.R., DOHRMANN G.J., FLANNERY J.T. (1984). Medulloblastoma in childhood: an epidemiological study. *J Neurosurg*, 61: 657-664.
- FIGARELLA-BRANGER D., DURBEC P.L., ROUGON G.N. (1990). Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors. *Cancer Res*, 50: 6364-6370.
- FIGARELLA-BRANGER D., GAMBARELLI D., DOLLO C., PEREZ-CASTILLO M., GENITORI L., CHOUX M., PELLISSIER J.F. (1991). Infratentorial ependymomas of childhood correlations between histological features, immunocytochemical phenotype, AgNORs value and post-operative survival in 16 cases. *Acta Neuropathol*, 82: 208-216.
- FIGARELLA-BRANGER D., PELLISSIER J.F., DAUMAS-DUPORT C., DELISLE M.B., PASQUIER B., PARENT M., GAMBARELLI D., ROUGON G., HASSOUN J. (1992). Central neurocytoma, critical evaluation of a small cell neuronal tumor. *Am J Pathol*, 16: 97-109.
- FINNE J., FINNE U., DEAGOSTINI-BAZIN H., GORIDIS C. (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 112: 482-487.
- GENNARINI G., ROUGON G., DEAGOSTINI-BAZIN H., HIRN M., GORIDIS C. (1984). Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecules N.CAM: a monoclonal antibody recognizing a cytoplasmic domain and evidence for the presence of phosphoserine residues. *Eur J Biochem*, 142: 57-64.
- GENNARINI G., CIBELLI G., ROUGON G., MATTEI M.G., GORIDIS C. (1989). The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin super-family related to chicken contactin. *J Cell Biol*, 109: 775-788.
- GOULD V.E., JANSSON D.S., MOLENAAR W.M., RORKE L.B., TROJANOWSKI J.Q., LEE V.M.Y., PACKER R.J., FRANK W.W. (1990). Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. Patterns of expression of neuroendocrine markers, and all classes of intermediate filament proteins. *Lab Invest*, 62: 498-503.
- HE H.T., BARBET J., CHAIX J.C., GORIDIS C. (1986). Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of N.CAM 120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO J*, 5: 2489-2494.
- HEKMAT A., BITTER-SUERMANN D., SCHACHNER M. (1990). Immunocytochemical localization of the highly polysialylated form of the neural cell adhesion molecule during development of the murine cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 291: 457-467.
- Hsu S.M., RAINE L., FANGER H. (1981). Use of avidin biotin peroxidase techniques. A comparative between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580.
- KADIN M.E., RUBINSTEIN L.J., NELSON J.S. (1970). Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal granular layer. *J Neuropathol Exp Neurol*, 29: 583-600.
- JIN L., HEMPERLY J.J., LLOYD R.V. (1991). Expression of neural cell adhesion molecule in normal and neoplastic human neuroendocrine tissues. *Am J Pathol*, 138: 961-969.
- KENNEDY P.G.E. (1982). Neural cell markers and their applications to neurology. *J Neuroimmunol*, 2: 35-53.
- KRUSE J., MAILHAMMER R., WERNECKE M., FAISSNER A., SOMMER J., GORIDIS C., SCHACHNER M. (1984). Neural cell adhesion molecules and myelin associated glycoprotein share a common carbohydrate

- moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK1. *Nature (Lond)*, 311: 153-155.
- MECHTERSHEIMER G., STAUDTER M., MÖLLER P. (1991). Expression of the natural killer cell-associated antigens CD56 and CD57 in human neural and striated muscle cells and in their tumors. *Cancer Res*, 51: 1300-1307.
- PERENTES E., RUBINSTEIN L.J. (1986). Immunohistochemical recognition of human neuro-epithelial tumors by anti-Leu7 (HNK1) monoclonal antibody. *Acta Neuropathol (Berl)*, 69: 227-233.
- PERSOHN E., SCHACHNER M. (1987). Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N.CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *J Cell Biol*, 105: 569-576.
- RATHUEN N., SCHACHNER M. (1984). Immunological and biochemical characterization of L1 antigen which is involved in cell adhesion. *EMBO J*, 3: 1-10.
- RORKE L.B. (1983). The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 42: 1-15.
- ROUGON G., DEAGOSTINI-BAZIN H., HIRN M., GORIDIS C. (1982). Tissue and development stage specific forms of neural cell surface antigen linked to differences in glycosylation of a common polypeptide. *EMBO J*, 1: 1239-1244.
- ROUGON G., DUBOIS C., BUCKLEY N., MAGNANI J., ZOLLINGER W. (1986). A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N.CAM. *J Cell Biol*, 103: 2429-2437.
- ROUGON G., MARSHAK D. (1986). Structural and immunological characterization of the amino terminal domain mammalian neural cell adhesion molecules. *J Biol Chem*, 261: 3396-3401.
- RUTISHAUSER U. (1989). Membrane apposition as a regulating parameter in cell-cell interactions. In: Landmesser L.T., ed.: "The assembly of the nervous system". New York Alan R. Liss inc. pp. 137-149.
- STEVENSON L., ECHLIN R. (1934). The nature and origin of some tumors of the cerebellum (medulloblastoma). *Arch Neurol and Psychiatr*, 31: 93-109.
- THEODOSIS D., ROUGON G., POULAIN D. (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: PSA in the hypothalamo-neuro-hypophyseal system. *PNAS*, 88: 5494-5498.
- WALSH F.S. (1988). The N.CAM gene is a complex transcriptional unit. *Neurochem Int*, 12: 262-267.
- WILLIAMS A., BARCLAY A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily, domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, 6: 381-405.
- WOLFF J.M., RAINER F., MUJOO K., SPIRO R., REIFELD R., RATHUEN F. (1988). A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem*, 263: 11943-11947.
- YAMAMOTO M., BOYER A.M., CRANDALL J.E., EDWARDS M., TANAKA H. (1986). Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. *J Neurosci*, 6: 3576-3594.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.